

Bibliographic Information

Immobilizing cells. Heusser, Christoph; Stocker, John. (Hoffmann-La Roche, F., und Co. A.-G., Switz.). Eur. Pat. Appl. (1980), 24 pp. CODEN: EPXXDW EP 15473 19800917 Patent written in German. Application: EP 80-100928 19800225. CAN 94:1803 AN 1981:1803 CAPLUS (Copyright 2005 ACS on SciFinder (R))

Patent Family Information

<u>Patent No.</u>	<u>Kind</u>	<u>Date</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
EP 15473	A1	19800917	EP 1980-100928	19800225
R: CH, DE, FR, GB, IT, NL				
JP 55120789	A2	19800917	JP 1980-23946	19800227

Priority Application

EP 1979-810019 A 19790228

Abstract

Cells are immobilized on a polymeric plate and used for studying the binding of antibodies to their surfaces. Thus, thymocytes from C57BL or DBA mice were suspended in buffer, applied to the surface of a PVC plate, and fixed to the plate with glutaraldehyde. Then antithymocyte serums from each mouse line against the thymocytes of the other line were added to the plate. The plate was washed, and 125I-labeled antimouse Ig was added. The plate was again washed and then counted to det. the extent of antiserum binding to the thymocytes.

THIS PAGE BLANK USPTO



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0015 473
A1

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 80100928.3

⑮ Int. Cl.³: C 12 N 11/08, G 01 N 33/54

⑭ Anmeldetag: 25.02.80

⑩ Priorität: 28.02.79 EP 79810019

⑯ Anmelder: F.HOFFMANN-LA ROCHE & CO.
Aktiengesellschaft, CH-4002 Basel (CH)

⑭ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 17.09.80
Patentblatt 80/19

⑰ Erfinder: Heusser, Christoph, Dr., Im
Niederholzboden 15, CH-4125 Riehen (CH)
Erfinder: Stocker, John, Dr., Gstaltenrainweg 67,
CH-4125 Riehen (CH)

⑮ Benannte Vertragsstaaten: CH DE FR GB IT NL

⑯ Vertreter: Lederer, Franz, Dr. et al, Patentanwälte Dr.
Franz Lederer Reiner F. Meyer Lucile-Grahn-Strasse 22,
D-8000 München 80 (DE)

⑭ Verfahren zum Immobilisieren von Zellen.

⑮ Es wird eine Methode zum Immobilisieren von Zellen an
eine Fläche beschrieben, bei der die Zellen mit Hilfe eines
Kupplungsmittels an die Oberfläche eines Plastikmaterials,
z.B. Polyvinylchlorid oder Polystyrol, gebunden werden. Das
Plastikmaterial wird vorzugsweise in Form einer Mikrofilterplat-
te verwendet. Als Kupplungsmittel wird vorzugsweise ein Al-
dehyd mit mindestens 2 Aldehydgruppen, insbesondere Gluta-
raldehyd verwendet. Die erwähnte Methode zum Immobilisie-
ren von Zellen eignet sich besonders zur Bestimmung der Bin-
dung von Antikörpern.

EP 0 015 473 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

25. Feb. '80
0015473

-1-

RAN 4090/111

F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Basel, Schweiz

Verfahren zum Immobilisieren von Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Immobilisieren von Zellen, welches bei der Bestimmung der Bindung von Antikörpern verwendbar ist.

5 Das Auffinden von Antikörpern gegen Oberflächenantigene von Zellen verlangt ein bequemes, reproduzierbares Nachweissystem. Nachweismethoden, bei denen die Bindung von Antikörpern gemessen werden, haben einen Vorteil gegenüber Nachweismethoden, bei denen eine Effektorfunktion des gebundenen
10 Antikörpers (Hämaggglutination, Zytotoxizität) untersucht wird. Mit Hilfe von Bindungsnachweisen können Antikörper aller Immunglobulinklassen aufgespürt werden. Im Weiteren können diese Nachweise zur Aufspürung von Antigenen auf der Oberfläche von diversen Zelltypen angewendet werden.

15 Die neuliche Entwicklung von Zellfusionstechniken, welche die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene von Zellen erlauben, hat das Bedürfnis nach einem raschen, gross angelegten Screeningtest für die Be-

stimmung solcher Antikörper im Ueberstand von Gewebskulturen hervorgerufen. Eine Methode, die jetzt verwendet wird, ist der Radicimmunoassay (RIA), bei dem die Bindung von Antikörpern an frische oder Glutaraldehyd fixierte Zellen in 5 Suspension gemessen wird. Durch die Zentrifugation und Resuspension der Zellen während der Waschvorgänge ist diese Nachweismethode jedoch zeitaufwendig.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich nun auf ein Verfahren zum Immobilisieren von Zellen biologischer Natur an 10 einer Fläche, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man diese Zellen mit Hilfe eines Kupplungsmittels an die Oberfläche eines Plastikmaterials bindet.

Gemäss dem Verfahren der vorliegenden Erfindung bleiben die Zellen während des Waschens und der Inkubation an 15 der Oberfläche des Plastikmaterials angeheftet. Die Zellen behalten ihre Oberflächenantigene, welche allo- und xenogenische Antikörper binden und in Radioimmunoassay oder anderen Bestimmungsmethoden, wie Immunofluoreszenz, Enzymimmunoassay oder bei Bestimmungen mit anderen ge- 20 eigneten Markierungsmitteln verwendet werden können. Zum Waschen der Zellen müssen die Platten lediglich in Pufferlösung getaucht werden, worauf überflüssige Pufferlösung weggeschüttet wird.

Das Verfahren gemäss vorliegender Erfindung eignet sich 25 besonders zur Immobilisierung von Blutzellen, z.B. Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten oder Granulozyten.

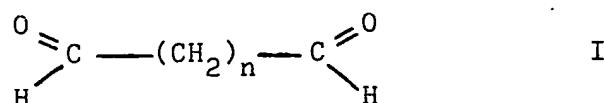
Andererseits können gemäss dem Verfahren gemäss vorliegender Erfindung Gewebskulturzellen, Tumorzellen oder transformierte Zellen immobilisiert werden.

Nach einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung 5 können Organzellen, z.B. normale oder pathologische Zellen, wie Milz- oder Thymuszellen, immobilisiert werden.

Nach einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung können Gewebskulturzellen, wie Fibroblastzellen, immobilisiert werden.

10 Das Kupplungsmittel, das gemäss vorliegender Erfindung zur Bindung der Zellen an die Oberfläche des Plastikmaterials verwendet wird, ist bevorzugt ein Aldehyd.

Bevorzugte Aldehyde sind solche, welche mindestens zwei 15 Aldehydgruppen aufweisen. Beispiele solcher Aldehyde entsprechen der allgemeinen Formel



worin n eine ganze Zahl von 0 bis 20 darstellt.

Ein ganz besonders bevorzugter Aldehyd ist Glutaraldehyd.

Alle Arten von Plastikmaterialien können gemäss vorliegender Erfindung verwendet werden. Besonders geeignet sind Polyvinylchlorid und Polystyrol. Als weiteres Beispiel 5 eines solchen Plastikmaterials sei Plexiglas erwähnt.

Nach einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird das Plastikmaterial, z.B. das Polyvinylchlorid oder das Polystyrol, in Form einer Microtiterplatte oder eines Röhrchens verwendet.

Nach einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung 10 werden die Zellen an eine Oberfläche gebunden, welche mit Antikörpern beladen ist, die mit den Zellen reagieren. Gemäss diesem Aspekt dienen die Antikörper als eine Zwischenschicht, welche das Binden der Zellen an das Plastikmaterial zustande bringt.

Beispiel 1Materialien und MethodenZellen

Mausthymozyten und Milzzellen werden aus 5 Wochen
5 alten C57BL/6 und DBA/2 Mäusen gewonnen. Die Entfernung der
Erythrozyten von der Milzzellensuspension erfolgt mit Hilfe
eines Ammoniumchlorid enthaltenden Puffers. Menschliche
Lymphozyten werden aus heparinisiertem Blut gewonnen.

Schaferythrozyten werden vor der Verwendung 4 Wochen
10 in Alsever's Lösung gelagert.

Antiseren

a) Mausalloantikörper. Ascites Antikörper gegen den
jeweils anderen Zellstamm werden in DBA/2 und C57BL/6
Mäusen erzeugt. Ein Gemisch von 5×10^7 Milz- und Thymuszellen
15 wird verwendet, und jede Maus erhält über 7 Tage verteilt ins-
gesamt 4 Injektionen. Die ersten zwei Injektionen erfolgen
intravenös und die weiteren intraperitoneal. Durch i.p. In-
jektion von 1 ml Freund's Adjuvans wird Ascites erzeugt.

b) Kaninchen Antiserum gegen Mausimmunglobulin (RaM Ig).
20 Kaninchen werden mit Maus IgG immunisiert, welches aus
Mausserum mittels Staphylococcal Protein A-Sepharose ge-
wonnen wurde.

Die Kaninchen erhalten 0,5 mg Maus IgG in komplettem Freund's Adjuvans an verschiedenen Stellen subkutan und erhalten 4 Wochen später Boosterinjektionen von 0,5 mg Maus IgG in Freund's inkompletten Adjuvans. 1 Woche nach 5 der Boosterinjektion wird das Serum entnommen, welches während 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert wurde.

Monoklonale Antikörper

Antikörper gegen menschliches β_2 -Mikroglobulin, menschliche B-Zellen Antigene und gegen einen nicht-poly-10 morphen Determinanten auf dem menschlichen HLA Komplex werden mit N 26/114, N 5/1 bzw. N 34 bezeichnet. Diese Antikörper werden gemäss dem Verfahren von Trucco et al. in Nature 273, 666 (1978) hergestellt.

Monoklonale Antischafererythrozyten Antikörper, Anti-15 trinitro-phenyl (TNP) Antikörper und überständiges Medium der Mausmyelomlinie X63 werden nach der Methode von G. Köhler und C. Milstein in Eur.J.Immunol. 6, 511 (1976) hergestellt.

Iodierung der spezifischen Antikörper

20 RaMIg wird iodiert, wobei es zum Schutz der Bindungsstellen der Antikörper an Maus Ig-gekuppelte Sepharose gebunden ist. Die markierten Antikörper

($[^{125}\text{I}]$ RaM Ig) werden mit 0,2 M Glycinhydrochlorid vom pH 2,3 enthaltend Trägerprotein eluiert.

Versuchsplatten

Es werden flexible Polyvinylchlorid Mikrotiterplatten mit U oder V Vertiefungen von Cooke Engineering Co., CA, U.S.A. (Nr. 220-24 und 220-25) verwendet. Zur Herstellung eines stabilen Zellmonolayer sind die Platten mit den U Vertiefungen besser geeignet (vgl. Resultate).

Glutaraldehydmethode zur Immobilisierung der Zellen an den Platten

Zellen werden 3-Mal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung vom pH 7,2 gewaschen. Zur Verteilung auf der Platte werden die Leukozyten auf $2,0 \times 10^7/\text{ml}$ resuspendiert und die Erythrozyten auf 0,2% in phosphatgepufferter Kochsalzlösung. 15 $50\text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension werden in die Vertiefungen gegeben, mit Ausnahme von Kontrollvertiefungen, welche ein Mass für die nicht-spezifische Bindung der serologischen Reagenzien an das Plastikmaterial liefern. Die Platten werden während 5 Minuten bei 50-100 X g zentrifugiert. Ohne die Zellschichten zu zerstören, werden die Platten bei 4°C in ein 1 l Becherglas getaucht, welches eine frisch zubereitete 0,25%ige Lösung von Glutaraldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung enthält. Zur Vermeidung der Zerstörung der

Zellschicht, sowie von Lufteinschlüssen in den Vertiefungen wird das Eintauchen sehr vorsichtig durchgeführt. Nach 5 Minuten wird die Platte entfernt und die Glutaraldehyd-lösung wird durch vorsichtiges Abschütteln verworfen. Durch 5 aufeinanderfolgendes 3maliges Eintauchen der Platte in Glasbecher enthaltend phosphatgepufferte Kochsalzlösung und jeweiliges Abschütteln der Platte wird freier Glutaraldehyd weggewaschen. Die Platte wird dann in einen Becher getaucht, welcher phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 1% Rinder-10 serumalbumin, 1% normal Kaninchenserum und 0,2% Natriumazid (RIA Puffer) enthält. Zur Sättigung der Proteinbindungsstellen auf dem Plastik wird die Lösung während einer Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dieser Zeit wird die Platte entweder sofort benutzt oder bei 4°C ohne 15 Änderung des Puffers gelagert.

Radioimmunverfahren unter Verwendung von Zellen die an Plastikmaterial gebunden sind

Der RIA Puffer wird von der Platte gegossen, und es werden 50 μ l von Verdünnungen der Antiseren oder von überständigem Medium enthaltend monoklonale Antikörper zugegeben. 20 Die Platte wird während einer Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Darauf wird die Platte wie vorher erwähnt durch nachfolgendes Eintauchen in phosphatgepufferte Kochsalzlösung gewaschen. Zu jeder Vertiefung werden dann 25 μ l 25 RIA Puffer enthaltend $2-4 \times 10^4$ cpm [125 I]RaM Ig gegeben, worauf die Platte während einer weiteren Stunde bei Raum-

temperatur gehalten wird.

Zuerst wird der grosse Teil des ungebundenen radioaktiven Materials entfernt und dann der Rest durch Waschen wie oben beschrieben. Es werden 3 Tropfen phosphatgepufferte Kochsalz-
5 lösung zu jeder Vertiefung gegeben, und die Lösung wird ab-
gesaugt oder durch Papiertücher, welche durch Aluminium-
folien geschützt sind, absorbiert. Nach 4 Waschvorgängen
werden die Platten getrocknet und dann mit einem heissen
Draht geschnitten. Während des Schneidens werden die Platten
10 durch eine starre, Polystyrol Mikrotiterplatte (Cooke
Engineering Co., CA, U.S.A., No. 220M-25 AR) gehalten. Zur
Zählung der Radioaktivität werden die Vertiefungen
in Röhrchen gegeben.

Resultate

15 Haftung der Zellen an der Plastikplatte

Verschiedene Mengen von Mausmilzzellen entweder in Form
der ursprünglichen Suspension oder nach Entfernung der
Erythrozyten werden in die Vertiefungen von V oder U Mikro-
titerplatten gegeben. Das Immobilisieren und Waschen erfolgt
20 wie früher angegeben. Eine Untersuchung mit dem Präparier-
mikroskop ergibt, dass ein Zellmonolayer entsteht, wenn
1-2x10⁶ Milzzellen zur U-Platte gegeben werden. Im Fall
der V-Platte oder auch im Fall der U-Platte
wenn eine grössere Anzahl von Zellen zugegeben werden,
25 tendieren die Zellen zu einem Kügelchen zusammenzuballen,

welches gelegentlich während des Waschens von der Platte gehoben wird. In den nachfolgenden Experimenten wurden U-Platten verwendet.

Zu den so auf der Platte fixierten Zellen wird [¹²⁵I] 5 RaM Ig gegeben, um ein Mass zu liefern für die Anzahl der gebundenen Zellen, welche Oberflächen Ig aufweisen. Nach einer Stunde stehenlassen bei Raumtemperatur werden die Platten gewaschen, worauf für jede Vertiefung die Radioaktivität gezählt wird. Wie man der Tabelle 1 entnehmen 10 kann, zeigte die an die Zellen gebundene Radioaktivität ein Maximum bei $1-2 \times 10^6$ zugegebener Milzzellen. Der Grad der Bindung war für die beiden verwendeten Zellpräparate ähnlich. Es konnte so gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Erythrozyten mit der Bindung des radioaktiv markierten Antikörpers an die Lymphozyten in der Zellschicht nicht interferiert. 15

Oberflächenantigene von Mauszellen, die an eine Platte gebunden sind

Es wird die Reaktion von Alloantiseren gegen Oberflächen- 20 antigene von Zellen überprüft, die mittels Glutaraldehyd an die Platte gebunden sind. Es werden Thymozyten verwendet, denn diese Zellpopulation enthält wenig Zellen mit oberflächlichem Ig. Damit kann ein direktes Binden von [¹²⁵I] RaM Ig an die Zellen auf ein Minimum gebracht werden. Zu 25 jeder Vertiefung werden $1,0 \times 10^6$ Thymozyten von DBA/2 oder

C57BL/6 Mäusen zugegeben und mit Glutaraldehyd fixiert.

50 μ l von Verdünnungen von entweder Alloantiseren C57BL Anti-DBA oder DBA Anti-C57BL werden zugegeben, worauf man die Platten eine Stunde stehen lässt und dann wäscht.

5 Hierauf wird [¹²⁵I]RaMIg zugegeben. Die Ergebnisse der Bindung dieser beiden Antiseren sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Spezifität dieser Antiseren für die relevanten Markerzellen wird demonstriert.

Bindung von Antiseren zu fixierten und unfixierten Zellen

10 Die Resultate der Bindung der Alloantiseren zu Zellen, welche an die Platte angeheftet sind, werden verglichen mit den Resultaten der Bindung zu unfixierten Thymozyten und zu in Suspension fixierten Thymozyten. Wie in Tabelle 3 gezeigt wird, haben die an Plastik gebundenen Zellen ein gleich hohes
15 Bindungsvermögen für die Alloantiseren wie die fixierten oder unfixierten Zellen in der Suspension. Da die selbe Zahl von Zellen ($1,0 \times 10^6$) für jede Bestimmung verwendet wird zeigt dies Resultat an, dass die Glutaraldehyd-Bindungsmethode die Bindung und Beibehaltung aller auf die Platte gegebener
20 Zellen erlaubt. Das spezifische Signal beurteilt durch die Differenz zwischen Bindung an relevante und irrelevante Markerzellen ist für die an die Platte angehefteten Zellen äusserst ausgeprägt. Im Weiteren kann gezeigt werden, dass Zellen, welche mittels Glutaraldehyd an die Platte gebunden sind und während 7 Wochen vor der Bestimmung bei 4°C
25 in RIA-Puffer gelagert wurden, eine ähnliche Bindungs-

25.02.80 M

12

0015473

kapazität aufweisen wie diejenigen, die am Tag der Bestimmung auf die Platte gebunden werden (diese Daten sind nicht gezeigt).

Verwendung von an die Platte angehefteten Zellen zur Auf-

5 finding monoklonaler Antikörper

Ueberständiges Medium von Kulturen, welche monoklonale Mausantikörper produzieren, werden bezüglich ihrer Bindung an Zellen, welche an die Platte angeheftet sind, überprüft. Diese Antikörper von bekannten Ig-Subklassen haben eine Spezifität 10 für definierte Oberflächenantigene von Zellen. Es werden Zellschichten menschlicher peripherer Blutlymphozyten (PBL) und rote Blutzellen von Schafen (SRBC) verwendet. 50 μ l von überständigem Medium von Hybridzellkulturen werden zugegeben und die Bindung zu den zwei Zelltypen wird untersucht. Aus 15 Tabelle 4 geht hervor, dass die Antikörper auf den relevanten Markerzellen gefunden werden konnten. Im Falle von N 5/1, einem Antikörper, welcher gegen menschliche B-Zellen Oberflächenantigene gerichtet ist, ist die Bindung 5mal geringer als die Bindung von Anti- β_2 -Mikroglobulin. Dies entspricht 20 dem Vorherrschen der B-Zellen innerhalb von PBL.

0015473

-15-

Tabelle 1

BINDUNG VON ^{125}I MARKIERTEM ANTI-MAUS Ig ZU MILZZELLEN, WELCHE AN DER PLATTE ANGEHEFTET SIND a

Zell Nr. ($\times 10^{-6}$)	Zugegebene Zellen		Milzzellen, bei denen die Erythrozyten entfernt wurden
	Ganze Milzzellen		
0.25	2954	\pm 283 b	2785 \pm 174
0.5	4289	\pm 279	4325 \pm 259
1.0	5184	\pm 266	5109 \pm 76
2.0	5475	\pm 660	6130 \pm 281
4.0	4157	\pm 194	5212 \pm 217
Zell Nr.	640	\pm 218	

a Es werden verschiedene Mengen von ganzen Milzzellen oder von erythrozytenlosen Milzzellen auf die Platte gegeben zur Glutaraldehydfixierung. Die direkte Bindung von $[^{125}\text{I}]$ RaMIG wird gemessen.

b cpm. Mittel von 4 wiederholten Bestimmungen \pm Standarderror für den Durchschnitt (S.E.M.).

0015473

Tabelle 2

REAKTION VON ALLOANTISEREN MIT ZELLEN, WELCHE MITTELS GLUTARALDEHYD AN DER PLATTE ANGEHEFTET SIND a

Alloantiserum	Verdünnung	Thymocyten		Anzahl der Zellen	C57BL/6
		DBA/2	C57BL/6		
C57BL/6	1/100	3161 ± 148 b	275 ± 23		638 ± 27
Anti-DBA/2	1/1000	1494 ± 19	158 ± 11		208 ± 18
Kein Antiserum		144 ± 10	76 ± 6		
DBA/2	1/100	1099 ± 35	441 ± 53		120 ± 17
Anti-C57BL/6	1/1000	329 ± 12	226 ± 39		2334 ± 58
					881 ± 28

a Thymocyten von DBA/2 oder C57BL/6 Mäusen werden an der Platte angeheftet und die Bindung der Alloantiseren wird unter Verwendung von $[^{125}\text{I}]$ RaMIG gemessen.

b cpm. Durchschnitt von 4 nacheinanderfolgenden Bestimmungen ± S.E.M.

Tabelle 3

VERGLEICH DER BINDUNG VON ZELLEN, DIE AN DER PLATTE ANGEHEFTET SIND GEGENUEBER ZELLEN IN SUSPENSION a

In Abwesenheit von Serum ergaben die 3 Versuchstypen die folgenden nicht-spezifischen Aufnahmen: plattenfixiert, 160 ± 31 ; suspensionsfixiert, 117 ± 11 ; frische Suspension, 526 ± 376 . Diese Werte waren ähnlich für die 2 Thymocytenspenderstämme.

Thymocytentamm	Versuchstyp b	c	
		plattenfixiert	suspensionsfixiert
DBA/2	3544 \pm 353 c	1264 \pm 98	1510 \pm 394
C57BL/6	581 \pm 62	380 \pm 111	838 \pm 196
Anzahl der Zellen	265 \pm 43	333 \pm 38	299 \pm 69

a Die Bindung von Anti-DBA/2 (1:100) an DBA/2 oder C57BL/6 Thymocyten wurde nach 3 verschiedenen Versuchstypen bestimmt. Die Aufnahme von Anti-DBA/2 wird durch $[^{125}\text{I}]$ RaMIG bestimmt.

b Die 3 Versuchstypen waren: Zellschichten an der Platte angeheftet mittels Glutaraldehyd (plattenfixiert); in der Suspension mit Glutaraldehyd fixierte Zellen (suspensionsfixiert) und unfixierte Zellen in der Suspension (frische Suspension).

c cpm. Durchschnitt von 4-8 nacheinanderfolgenden Bestimmungen \pm S.E.M.

0015473

0015473

Tabelle 4

SPEZIFISCHE BINDUNG MONOKLONALER ANTIKOERPER AN ZELL-MONOLAYER a

Monoklonaler Antikörper	Bezeichnung	Spezifität	Bindung an Zellmonolayer		Nr. der Zellen
			menschliches PBL	SRBC	
N 34	HLA-Komplex		4279 ± 164 b	201 ± 31	285 ± 21
N 26/114	menschliches β_2		5116 ± 593	166 ± 12	356 ± 13
N 5/1	Mikroglobulin				
	menschliches		11150 ± 8	133 ± 17	182 ± 13
	B-Zellen Antigen				
Sp 2/HL	SRBC		323 ± 12	3596 ± 526	264 ± 22
Hy 2-19	TNP		465 ± 53	383 ± 33	672 ± 35
X53	unbekannt		264 ± 14	129 ± 8	142 ± 8
Puffer	-----		180 ± 8	150 ± 46	124 ± 9

a Monoklonale Mausantikörper verschiedener Spezifitäten wurden untersucht auf ihre Bindung an Zellschichten von menschlichen peripheren Lymphozyten (PBL) oder Schaferythrocyten (SRBC), welche mittels Glutaraldehyd an die Platten gebunden waren. Die Bindung der monoklonalen Antikörper wurde durch $[^{125}\text{I}]$ RaMIG bestimmt.

b cpm. Mittel von 4 nacheinanderfolgenden Bestimmungen ± S.E.M.

Beispiel 2

Die erfindungsgemäße Methode zur Immobilisierung von Zellen wird angewendet, um die Anwesenheit von Antikörpern gegen definierte menschliche Erythrozytenantigene zu untersuchen. Zu diesem Zwecke werden kommerziell erhältliche Antiseren gegen klinisch wichtige Rhesusantigene auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber immobilisierten Erythrozyten-Zell-Schichten von verschiedenen Rhesusgruppen untersucht.

Reagentien:

10 Antiseren sind von der Firma Merz & Dade, Düdingen (Schweiz) und sind gegen folgende Rhesus-Determinanten gerichtet: C, E, C^W, CDE, c, e, CD, DE.

15 Menschliche Erythrozyten werden von Biotest erhalten und haben folgende Genotypen: (CCD.ee), (ccD.EE), (C^WcD.Ec), (ccD.ee), (Ccddee) und (ccddee).

Protein A von *Staphylococcus aureus* zeigt eine hohe Affinität gegenüber dem Fc-Teil von Immunoglobulin G und wird von Pharmacia (Uppsala) erhalten. Protein A wird mit ¹²⁵I radioaktiv markiert und in den folgenden Experimenten 20 zur Bestimmung der Aufnahme von Antikörper an die Erythrozytenoberfläche verwendet.

Methode:

Die Methode ist dieselbe wie in Beispiel 1, mit der einzigen Ausnahme, dass für die Bestimmung von gebundenen Antikörpern radioaktiv markiertes Protein A verwendet wird.

5

Resultat:

Rhesusphänotyp der Erythrozyten	C	c	D
(CCD,ee)	3720	1260	3060
(ccD,EE)	540	7990	4680
(C ^W cD.Ec)	2800	6510	3220
(ccD.ee)	1020	7390	3580
(Gccdee)	3420	4360	380
(ccddEe)	1200	9830	300
(ccddee)	1110	8810	970

Patentansprüche

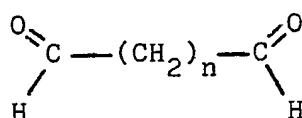
1. Verfahren zum Immobilisieren von Zellen biologischer Natur an eine Fläche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen mit Hilfe eines Kupplungsmittels an die Oberfläche eines Plastikmaterials gebunden werden.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Blutzellen sind.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Blutzellen Lymphozyten oder Erythrozyten sind.
10
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Blutzellen Thrombozyten oder Granulozyten sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Gewebskulturzellen, Tumorzellen oder transformierte Zellen sind.
15
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Organzellen sind.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Organzellen normal oder pathologisch sind.
20
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Organzellen Milz- oder Thymuszellen sind.

9. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Fibroblastzellen sind.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass das Kupplungsmittel ein Aldehyd ist.

5 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Aldehyd mindestens zwei Aldehydgruppen enthält.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Aldehyd die allgemeine Formel



10 worin n eine ganze Zahl von 0-20 bedeutet, aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel I Glutaraldehyd ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass das Plastikmaterial Polyvinylchlorid 15 oder Polyvinylstyrol ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Plastikmaterial in Form einer Mikrotiterplatte oder eines Röhrchens vorliegt.

16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass die Zellen an eine Oberfläche gebunden werden, welche
mit Antikörpern beladen ist, die mit den Zellen reagieren.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0015473
Nummer der Anmeldung

EF 50 0 1926

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl. 5)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 1)
X	FR - A - 2 321 127 (MT. SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) * Seite 21, Anspruch 1a; Seite 11, Zeilen 9-35 * --	1-3, 10-16	C 12 N 11/08 G 01 N 33/54
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 83, Nr. 3, 21. Juli 1975, Seite 358, Nr. 26137p Columbus, Ohio, U.S.A. S.Y. WONG et al.: "Immobilization of lymphocytes at surfaces by lectins" & EXP. CELL RES. 1975, 92(2), 428-34 * Zusammenfassung * --	1,3, 14,15	G 01 N 33/80 C 12 N 11/00 11/02 11/06 11/08
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 88, Nr. 11, 13. März 1978, Seite 216, Nr. 70986s Columbus, Ohio, U.S.A. B.O. MATTIASSEN et al.: "An analytical flow system based on reversible immobilization of enzymes and whole cells utilizing specific lectin-glucoprotein interactions" & FEBS LETT. 1978, 85(1), 119-23 * Zusammenfassung * --	1-3	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE
X	US - A - 4 078 971 (B. ARKLES et al.) * Spalte 6, Anspruch 12 * --	1,6	X. von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument 8. Mitglied der gleichen Patentfamilie. Übereinstimmendes Dokument:
X	FR - A - 2 265 758 (PFIZER INC.) * Seiten 13,14; Beispiel 21; ./.	1,10-13	
<p> Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p>			
Recherchenor:	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	30-05-1980	WALLINDER	





EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl. 3)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch
X	Seite 15; Ansprüche 1,5,11 * -- FR - A - 2 332 287 (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT) * Seite 17, Ansprüche 1,3; Seite 7, Zeilen 4,5 * --	1,2,10-13
A	DE - A - 1 806 418 (MILES LABORATORIES) * Seiten 24,25; Ansprüche 1,2, 5 * --	1,2
E	GB - A - 2 004 892 (E.A. FISCHER) * Seite 3, Zeilen 36-43; Seite 7, Anspruch 34 * & FR - A - 2 410 012 & DE - A - 2 840 768 & NL - A - 78 09205 & EP - A - 0 001 223 --	1-4
E	GB - A - 2 005 275 (E.A. FISCHER) * Seite 2, Zeilen 119-125; Seite 5, Anspruch 1 * & FR - A - 2 403 386 & DE - A - 2 840 767 & NL - A - 78 09332 & EP - A - 0 001 224 ----	1-4

THIS PAGE BLANK (USPTO)